

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-297121

(43)Date of publication of application : 18.11.1997

(51)Int.Cl.

G01N 27/327

G01N 27/416

G01N 33/92

(21)Application number : 08-341001

(71)Applicant : MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD

(22)Date of filing : 20.12.1996

(72)Inventor : YAMAMOTO TOMOHIRO
IKEDA MAKOTO
YOSHIOKA TOSHIHIKO
NANKAI SHIRO
IWATA JIYUNOKO

(30)Priority

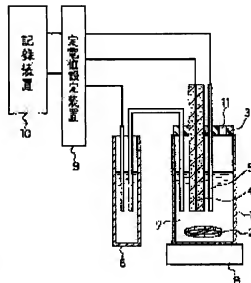
Priority number : 08 49933 Priority date : 07.03.1996 Priority country : JP

(54) CHOLESTEROL SENSOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To quickly perform a measurement by providing an electrode system having a measuring electrode and a counter electrode, and a reaction reagent system, and containing at least cholesterol dehydrogenase(ChDH), nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) and an electronic mediator in the reaction reagent system.

SOLUTION: This sensor has a measuring electrode 4, a counter electrode 5, and a reference electrode 6. A reaction solution 1 is formed of a buffer aqueous solution of Tris hydrochloride containing ChDH, NAD, and potassium ferricyanide and diaphorase as electronic mediator. When a sample solution containing cholesterol is dropped to the reaction solution 7, cholesterol is oxidized by ChDH to form cholesterin, and NAD is reduced to generate NADH, which performs the transfer of electron with ferricyanide ion, and is returned to NAD which is an oxidized body. Since a potential to the reference electrode 6 is applied to the measuring electrode 4, the ferricyanide ion delivers electrons to the measuring electrode 4. The movement of electron is observed, whereby the cholesterol concentration can be quantitatively determined.



【特許請求の範囲】

【請求項1】 測定極と対極を有する電極系、および反応試薬系を具備し、前記反応試薬系中に少なくともコレステロールデヒドロゲナーゼ、ニコチンアミドアデニンジマクシオチド、および電子メディエーターを含むことを特徴とするコレステロールセンサ。

【請求項2】 絶縁性の基板、前記基板上に設けられた測定極および対極を含む電極系、前記基板上に配されて基板との間に基板端部から前記電極系への試料液供給路を形成する溝を有するカバー部材、および前記試料液供給路に露出する部分に設けられた反応試薬系を含む反応層を具備し、前記反応試薬系中に少なくともコレステロールデヒドロゲナーゼ、ニコチンアミドアデニンジマクシオチド、および電子メディエーターを含むことを特徴とするコレステロールセンサ。

【請求項3】 電子メディエーターが、フェリシアン化物、1, 2-ナフトキノン-4-スルホン酸、2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール、ジメチルベンゾキノ、1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムサルフェート、メチレンブルー、ガロシアニン、チオニン、フェナジニメチサルフェート、およびメチルドラブールからなる群より選択される少なくとも一種である請求項1または2に記載のコレステロールセンサ。

【請求項4】 前記反応試薬系中にジアホラーゼを含む請求項1または2に記載のコレステロールセンサ。

【請求項5】 前記反応試薬系中にコレステロールエステラーゼおよび界面活性剤を含む請求項1または2に記載のコレステロールセンサ。

【請求項6】 前記反応層が、前記電極系上およびカバー部材側に分割して設けられている請求項2に記載のコレステロールセンサ。

【請求項7】 前記反応層中の少なくとも一部に親水性高分子を含む層を有する請求項2または6に記載のコレステロールセンサ。

【請求項8】 前記反応層中の少なくとも一部に親水性高分子と電子メディエーターが混合された層を有する請求項2または6に記載のコレステロールセンサ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、試料中のコレステロールについて、迅速かつ高精度で定量を簡便に実施することができるコレステロールセンサに関する。

【0002】

【従来の技術】従来、試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などを行うことなく簡易に定量する方法として、様々なバイオセンサが提案されている。バイオセンサの一例として、まずグルコースセンサを説明する。酵素電極を用いたグルコースの定量方法としては、グルコースオキシダーゼと酸素電極あるいは過酸化水素

電極とを組み合わせた方式が一般に知られている。グルコースオキシダーゼは、酸素を電子メディエーターとして基質であるβ-D-グルコースをD-グルコン酸として選択的に酸化する。この反応にともない、酸素は過酸化水素に還元される。このときの酸素消費量を酸素電極によって測定するか、もしくは過酸化水素の生成量を白金電極等を用いた過酸化水素電極によって測定することによりグルコースの定量が行われる。

【0003】しかし、上記の方法では、酸素のない条件下では測定が不可能である。そこで、酸素を電子メディエーターとして用いず、フェリシアン化カリウム、フェロセン誘導体、キノン誘導体等の金属錯体や有機化合物を電子メディエーターとして用いるタイプのグルコースセンサが開発されている。このタイプのセンサでは、酵素反応の結果生じた電子メディエーターの還元電位を電極で酸化することにより、その酸化電流からグルコース濃度が求められる。この手法は、グルコースに限らず他の基質の定量にも広く応用されている。

【0004】この種のバイオセンサの一例として、次のようなグルコースセンサが知られている（特開平2-062952号公報）。すなわち、絶縁性の基板上にスクリーン印刷等の方法で測定極、対極および参照極からなる電極系を形成し、この電極系上に、電極系に接して反応試薬系として、親水性高分子と酸化還元酵素と電子メディエーター、必要に応じて加えた緩衝剤を含む反応層を形成したものである。基質を含む試料液を反応層上へ滴下すると、反応層が溶解し、緩衝剤の緩衝作用により最も高い酵素活性の得られるpHに調整され、酵素と基質が反応し、さらに電子メディエーターが還元される。酵素反応終了後、この還元された電子メディエーターを電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求めるものである。

【0005】このようなバイオセンサは、測定対象物質を基質とする酵素を用いることで、様々な物質に対する測定が原理的には可能である。酸化還元酵素にコレステロールオキシダーゼを用いば、血清中のコレステロールを測定するバイオセンサを構成することができる。しかし、診断指針として用いられる血清コレステロール値は、コレステロールとコレステロールエステルの濃度を合計したものである。コレステロールエステルはコレステロールオキシダーゼによる酸化反応の基質になることができないので、診断指針としての血清コレステロール値を測定するためには、コレステロールエステルをコレステロールに変化させる過程が必要である。この過程を触媒する酵素として、コレステロールエステラーゼが知られている。そこで、現在使用されている方法は、次の一般反応式に基づいて行われる。

【0006】

【化1】

コレステロールエステル+H₂O → コレステロール+脂肪酸

コレステロール+電子メディエーター（酸化体） →

コレステノール電子メディエーター（還元体）

電子メディエーター（還元体） → 電子メディエーター（酸化体）

【0007】

【発明が解決しようとする課題】ところが上に示したような、コレステロールオキシダーゼによってコレステロールを酸化させる反応において、酵素以外の化合物を電子メディエーターとして用いた場合、酵素と酵素間の二次反応速度が電子メディエーターと酵素間の二次反応速度に比べて大きいために、試料液中に酵素が溶存した場合、電極から得られる電子メディエーターの酸化電流値は、試料液中の基質の酸化反応がすべて電子メディエーターの還元反応と共役した場合に得られると予想される数値より低くなる傾向にあった。このため、特に試料液中の基質濃度が低いときの応答が正確ではない場合があるという問題を有していた。また、反応に要する時間が長くなるという問題もあり、これを避けるためにコレステロールオキシダーゼの担持量を増加させると、製造コストの増加を招き、また、センサに担持される試薬量の増加は、センサの構成を物理的に困難にするという問題があった。

【0008】本発明は、このような問題点を解決するもので、高精度かつ高精度な定量が可能なコレステロールセンサを提供することを目的とするものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】この目的を達成するために本発明のコレステロールセンサは、測定極と対極を有する電極系、および反応試薬系を具備し、反応試薬系に少なくともコレステロールデヒドロゲナーゼ、ニコチンアミドアデニヌクレオチド、および電子メディエーターを含む構成を有する。この構成により、酵素の影響を受けることなく、迅速にコレステロール濃度を測定できるバイオセンサを得ることができる。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明のコレステロールセンサは、上記の反応試薬を溶液とし、この溶液中に電極系を浸漬する構成とすることができるが、反応試薬を乾燥状態で電極系上またはその近傍に配置した構成とすることにより、安価に作製することができ、かつ使用が簡便なコレステロールセンサを得ることができる。すなわち、絶縁性の基板、前記基板上に設けられた測定極および対極を含む電極系、並びに前記基板上に配されて基板との間に基板端部から前記電極系への試料液供給路を形成する溝を有するカバー部材によりセンサ本体を構成し、前記試料液供給路に露出する部分に反応試薬系を含む反応層を形成するのである。

【0011】このような構成のコレステロールセンサについて、反応層の配置に関しいくつかの好ましい形態を

以下に説明する。第1の構成例は、基板の電極系上に反応層を有する。この反応層を形成するに際しては、電極系上にCMCのような親水性高分子の層を形成し、反応層の構成成分である酵素や電子メディエーターが電極系表面に直接接触するのを阻止するのが好ましい。これによって、電極系表面へのタンパク質の吸着や、フェリシアン化カリウムのような酸化能を有する物質の化学的作用による電極系の特性変化が起こり難くなる。

【0012】第2の構成例は、反応層が電極系上およびカバー部材側に分割して形成されている。特に、反応試薬として、高いpH下で比較的不安定な1, 2-ナフトキノン-4-スルホン酸カリウムのような電子メディエーターとトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩酸（以下、Tris塩酸塩と略す）緩衝剤のような緩衝剤を含む場合は、両者を分離して配置するのが好ましい。例えば、カバー部材の試料液供給路に露出する部分に1, 2-ナフトキノン-4-スルホン酸カリウムのような電子メディエーターの層を形成し、基板の電極系上にはTris塩酸塩のような緩衝剤を含む反応層を形成する。

【0013】第3の構成例は、1, 2-ナフトキノン-4-スルホン酸カリウムのような電子メディエーターとTris塩酸塩のような緩衝剤が同じ基板上に分割して形成されている。例えば、電極系上に前記緩衝剤を含む反応層が形成され、この反応層よりも試料液供給路の開口部側に1, 2-ナフトキノン-4-スルホン酸カリウムのような電子メディエーターを含む層を設ける。後者の層の下地に親水性高分子の層を形成するか、またはそれらの層に親水性高分子を混合するのが好ましい。

【0014】第4の構成例は、基板上の電極系上には親水性高分子の層を有し、カバー部材の試料液供給路に露出する部分に反応層が形成されている。なお、第2および第3の構成例においても、電極系上には親水性高分子の層で被覆されているのが好ましい。また、第2および第3の構成例において、カバー部材側に電子メディエーターなどを含む層を形成する際は、その下地に親水性高分子の層を形成するか、またはそれらの層に親水性高分子を混合するのが好ましい。また、上記の反応層上またはその近傍にレシチンの層を設けて、電極系への試料液の導入を円滑にすることが好ましい。

【0015】本発明において、好ましい電子メディエーターとしては、フェリシアン化合物、1, 2-ナフトキノン-4-スルホン酸、2, 6-ジクロロフェノール、1-メトキシ-5-メチルフェニルジメチルサルフェート、メチレンブルー

一、ガロシアニン、チオニン、フェナジニメトサルフェート、およびメルドラプラーからなる群より選択される少なくとも一種である。また、反応試薬系中にジアホラーゼを含むことが好ましい。ジアホラーゼは、電子メディエーターとニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの還元体との反応を触媒し、測定時間の短縮に役立つ。

1、2-ナフトキノン-4-スルホン酸カリウムのように、ジアホラーゼの触媒作用なしでも、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの還元体と非常に速い酸化還元反応を行う電子メディエーターを用いる場合は、ジアホラーゼは特に必要としない。反応試薬系中にコレステロールエステラーゼおよび界面活性剤を含むことが好ましい。

【0016】

【実施例】以下、本発明の実施例を説明する。

《実施例1》図1は本実施例のコレステロールセンサを示している。1はガラスセルであり、内に攪拌子2を入れ、スタラマシシ8上に固定されている。ガラスセル1には、電極固定器具3により、測定極4、対極5、および参照極6がセットされている。測定極4はグラッシーカーボン電極で、また対極5は白金線でそれぞれ構成されている。参照極6は、銀/塩化銀電極で構成され、アガロースゲルにKC1溶液を浸漬させた塩橋を介してガラスセルに接続されている。これらの電極は、それぞれ電位設定装置9を介して、記録装置10に接続されている。以上の各要素から測定装置系が構成されている。

【0017】前記ガラスセル1中には、反応溶液7が満たされており、反応溶液7は攪拌子2によって攪拌される。反応溶液7は、コレステロールデヒドロゲナーゼ（以下、ChDHと略す）、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（以下NADと略す）、電子メディエーターとしてのフェリシアン化カリウム、およびジアホラーゼを含むTris塩酸塩の緩衝水溶液である。各反応試薬の望ましい濃度は以下のとおりである。

ChDH=10ユニット/ml、NAD=25mM/
1、ジアホラーゼ=20ユニット/ml、フェリシアン化カリウム=100mM/1、Tris塩酸塩=0.3M/1。

ここにあげた濃度であることが望ましいが、必要に応じて、使用条件により、一部異なる濃度を用いても、適切な応答を得ることができる。pHは8.0から9.0の範囲内であることが望ましい。pHが8.0より低いと反応所用時間が著しく増加し、またpH9.0以上では、コレステロールの単位濃度あたりに対する電流値が小さくなり、逆に非酵素的な化学反応によると考えられる残余電流値が増大する。

【0018】上記の測定極4には、参照極6に対して500mVの電位が印加されている。コレステロールを含む試料液を電極固定器具3の貫通孔11より反応溶液7

中に滴下すると、ChDHによりコレステロールが酸化されてコレステノンになり、この反応と共役して、NADが還元され、その還元体であるNADHが生成される。生成したNADHは、フェリシアン化物イオンとの間に電子の授受を行い、酸化体であるNADに戻る。フェリシアン化物イオンは、NADHから電子を受け取り、フェロシアン化物イオンに還元される。このようにして生成されるフェロシアン化物イオンの濃度は、試料液中のコレステロール濃度に比例する。この酸化還元反応はジアホラーゼにより触媒される。ジアホラーゼなしで自発的に反応は進行するが、ジアホラーゼの存在により非常に速く反応を進行させることができる。

【0019】前述したように、測定極4には参照極6に対して500mVの電位が印加されているため、フェロシアン化物イオンは測定極4に電子を渡し、フェリシアン化物イオンに戻る。なお、測定極4がグラッシーカーボン電極で、測定極4近傍の電位が、銀/塩化銀電極に対して500mVなので、NADHが測定極4において電気化学的に酸化される量はきわめて少ないと考えられる。測定極4で受け取った電子の移動を電流として観測することにより、試料液中のコレステロール濃度を定量することができる。試料液が血清のようにコレステロールエステルを含む場合には、反応溶液7中に前記成分の他に、さらにコレステロールエステラーゼ、およびコレステロールエステラーゼの触媒性を促進させるための界面活性剤を添加することにより、コレステロールエステルとコレステロールの濃度の比を測定することができる。

【0020】本実施例の測定例を図2、および図3に示す。図2は、電流値の経時変化を記録装置10により記録したものであり、図3は、図2の電流値とコレステロール濃度の関係を示したグラフである。これらに示すように、コレステロールの滴下に伴い電流値が増加し、1分以内に定常値に達し、電流値とコレステロール濃度は非常に良好な直線関係を示した。

【0021】《実施例2》図4は本実施例のコレステロールセンサのうちカバーおよびスベアを除いた縦断面図であり、図5は反応層を除いたコレステロールセンサの分解斜視図である。12はポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板を示す。この基板12上には、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷してリード13、14を形成してある。基板12上には、さらに樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを印刷することにより、測定極15と対極16を含む電極系、および絶縁性ペーストを印刷することにより絶縁層17をそれぞれ形成してある。絶縁層17は、測定極15及び対極16の露出部分の面積を一定とし、かつリードを部分的に覆っている。

【0022】このようにして電極部分を作製した後、電極系上に、親水性高分子カルボキシメチルセルロースの

ナトリウム塩（以下CMCと略す）の0.5wt%水溶液を滴下し、50℃の温風乾燥器中で10分間乾燥させ、CMC層18を形成した。つづいて、ノルゲリア由来のChDHを1.0ユニット/ml、補酵素であるNADを5.0mM/l、シュドモナス由来の酵素ジアホラーゼを1.0ユニット/ml、電子メディエーターであるフェリシアン化カリウムを5.0mM/l、シュドモナス由来のコレステロールエステラーゼ（以下ChEと略す）を1.0kユニット/ml、界面活性剤であるn-オクチルβ-D-チオグルコシドを0.5wt%、および緩衝剤であるTris塩酸塩0.3M/lを含む混合水溶液を、pH8.5に調整した。この水溶液をCMC層18上に5μlずつ滴下し、常温乾燥空気中で30分間乾燥させることにより、ChDH-ChE-フェリシアン化カリウム-界面活性剤-NAD-ジアホラーゼ-緩衝剤層19を形成した。

【0023】この場合、CMCとChDH、ChE、フェリシアン化カリウム、n-オクチルβ-D-チオグルコシド、NAD、および緩衝剤は、部分的に混合された状態で厚さ数ミクロンの薄膜状となっている。すなわち、CMC層上に前記水溶液を滴下すると、最初に形成したCMC層は一度溶解し、その後の乾燥過程で酵素などと混合された形で層を形成する。しかし、攪拌等をとまなわなため完全な混合状態とはならず、電極系表面はCMCのみにより被覆された状態となる。このため、酵素および電子メディエーターなどが電極系表面に接触しないから、電極系表面へのタンパク質の吸着や、フェリシアン化カリウムのような酸化能を有する物質の化学的作用による電極系の特性変化が起こり難くなる。その結果、高精度なセンサ応答を有するセンサ得ることができる。このChDH-ChE-フェリシアン化カリウム-界面活性剤-NAD-ジアホラーゼ-緩衝剤層19の上に、ホスファチルコリンの0.5wt%トルエン溶液を5μl滴下して乾燥させ、レシチン層20を形成した。このレシチン層を設けることにより、試料溶液の導入が円滑に行われる。このレシチン層は、酵素反応には必須ではない。

【0024】上記のようにしてCMC層18、ChDH-ChE-フェリシアン化カリウム-界面活性剤-NAD-ジアホラーゼ-緩衝剤層19、およびレシチン層20からなる反応層を形成した後、カバー25およびスぺーサー24を図4中、一点鎖線で示すような位置関係をもちて接合することにより、コレステロールセンサが完成する。こうして組み立てられたセンサは、スぺーサー24のスリット26の部分に試料液供給路28が形成される。このコレステロールセンサは、試料液をセンサ先端の試料液供給路28の開口部に接触させるだけの簡易操作で、試料液は容易に反応層部分へ導入される。試料液の供給量は、試料液供給路28の容積に依存するため、あらかじめ定量する必要はない。さらに、測定中の

試料液の蒸発を最小限に抑えることができ、精度の高い測定が可能となる。なお、図4中、27はカバー25に設けた空気孔である。ここで、カバー25およびスぺーサー24に透明な高分子材料を用いると、反応層の状態や試料液の導入状況を外部から容易に観察することができる。

【0025】こうして作製したコレステロールセンサに、試料液としてコレステロール標準液3μlを試料液供給路の開口部より供給し、3分後に対極を基準にして測定極にアノード方向へ+0.5Vのバルス電圧を印加し、5秒後の電流値を測定した。試料液が反応層へ到達すると、レシチン層20を溶解し、引続きChDH-ChE-フェリシアン化カリウム-界面活性剤-NAD-ジアホラーゼ-緩衝剤層19を溶解した。試料液中のコレステロールエステルは、ChDH-ChE-フェリシアン化カリウム-界面活性剤-NAD-ジアホラーゼ-緩衝剤層19中のn-オクチルβ-D-チオグルコシドにより再分散され、ChEの触媒作用によりコレステロールになり、コレステロールはChDHにより酸化され、この酸化反応に共役してNADが還元され、NADHが生じ、NADHはジアホラーゼの触媒作用により、再び酸化されてNADに戻る。このNADHの酸化反応に共役してフェリシアン化物イオンがフェロシアン化物イオンに還元される。次に、上記のバルス電圧の印加により、生成したフェロシアン化物イオンおよび一部NADHの酸化電流が得られ、この電流値は基質であるコレステロールの濃度に対応する。なお、観測される電流値には、一部NADHの酸化電流が含まれている可能性があるが、反応試薬系へのジアホラーゼの添加により、測定所用時間が短縮されることから、NADHの測定極上での電気化学的な酸化が測定値に占める割合は、きわめて低いと思われる。

【0026】《実施例3》実施例2と同様に、基板上の電極系上にCMC層18を形成した。次に、スぺーサー24とカバー25を組み合わせることで、スリット26の部分に形成される凹部にもCMCの0.5wt%水溶液を滴下し、乾燥させてCMC層23を形成した。このCMC層23を覆うようにして、電子メディエーターである1,2-ナフトキノール-4-スルホン酸カリウム（以下NQSと略す）の50mM溶液を5μl滴下し、常温空気中で乾燥させ、NQS層21を形成した。スぺーサー24とカバー25を組合せたカバー部材間に上部反応層を形成する場合、このCMC層23がないと、反応層が剝離し易くなるので、CMC層23を設けるのが好ましい。CMC層23とNQS層21を設けるのかわりに、CMC水溶液にNQSを溶解した溶液を滴下して、CMCとNQSの両者を含む層を設けることもできる。NQSは、高いpH下で比較的安定なもので、Tris塩酸塩のような緩衝剤を含む溶液に溶解して、長時間放置することができないが、このように緩衝剤と分

離することにより、センサ中に電子メディエーターとして組み入れることができる。

【0027】次に、ノルジャ由来のChDHを10ユニット/ml、補酵素であるNADを50mM、シュドモナス由来のChEを1kユニット/ml、界面活性剤であるn-オクタリル- β -D-チオグルコシドを0.5wt%、および緩衝剤であるTris塩酸塩0.3Mを含む混合水溶液を、pH8.5に調整した。この水溶液を電極系上のCMC層18上に5 μ lずつ滴下し、常温乾燥空気中で30分間乾燥させることにより、ChDH-ChE-界面活性剤-NAD-緩衝剤層22を形成した。NQSのように、ジアホラーゼの触媒作用なしでも、NADHと非常に速い酸化還元反応を行う電子メディエーターを用いる場合は、本実施例のように、ジアホラーゼを省略できる。測定時間を更に短縮する必要がある場合は、本実施例の構成に、ジアホラーゼを加えることもできる。このChDH-ChE-界面活性剤-NAD-緩衝剤層22の上層に実施例2と同様にホスファチジルコリンの0.5wt%トルエン溶液を5 μ l滴下し、乾燥させてレシチン層20を形成した。以上によりしてコレステロールセンサの下部反応層が形成される。

【0028】上記の上部反応層を形成したスぺーサーとカバーの組合せと、下部反応層を形成した絶縁性基板を組み合わせることによりコレステロールセンサが完成する。このようにして得られたコレステロールセンサの構造を図6に示す。このようにして作製したコレステロールセンサによって得られたコレステロール標準溶液に対する応答は、コレステロール濃度に対して直線性を示した。

【0029】《実施例4》図7は本実施例のコレステロールセンサの縦断面図である。まず、実施例2と同様にして基板上の電極系上にCMC層18を形成した。さらに、このCMC層18と試料液供給路28の開口部に相当する基板先端部との間の、電極部分を被覆しない位置に、前記CMC層18に接触しないように、CMC層18と同様にしてCMC層29を形成した。このCMC層29とCMC層18は、同じものである必要はない。つまり、ノルジャ由来のChDHを10ユニット/ml、補酵素であるNADを50mM、シュドモナス由来の酵素ジアホラーゼを10ユニット/ml、電子メディエーターであるフェリシアン化カリウムを50mM、シュドモナス由来のChEを1kユニット/ml、界面活性剤であるn-オクタリル- β -D-チオグルコシドを0.5wt%、および緩衝剤であるTris塩酸塩0.3Mを含む混合水溶液をpH8.5に調整した。この混合水溶液を5 μ lずつ、CMC層29に接触しないように、CMC層18上に滴下し、常温乾燥空気中で30分間乾燥させることにより、ChDH-ChE-フェリシアン化カリウム-界面活性剤-NAD-ジアホ

ラーゼ-緩衝剤層19を形成した。

【0030】さらに、CMC層29を覆うようにして、電子メディエーターであるNQSの50mM溶液を5 μ l滴下し、常温空気中で乾燥させ、NQS層21を形成した。CMC層29とNQS層21を設けるかわりに、CMC水溶液にNQSを溶解した溶液を滴下して、CMCとNQSを含む層を設けることもできる。NQSは、高いpH下で比較的不安定なので、Tris塩酸塩のような緩衝剤を含む溶液に溶解して、長時間放置することができないが、このように緩衝剤と分離することにより、センサ中に電子メディエーターとして組み入れることができる。NQS層21を形成するために前記NQS溶液をCMC層29上に滴下する際、NQS溶液をChDH-ChE-フェリシアン化カリウム-界面活性剤-NAD-ジアホラーゼ-緩衝剤層19に接触しないようにする必要がある。

このChDH-ChE-フェリシアン化カリウム-界面活性剤-NAD-ジアホラーゼ-緩衝剤層19およびNQS層21の上に、ホスファチジルコリンの0.5wt%トルエン溶液を5 μ l滴下し乾燥させてレシチン層20を形成した。このレシチン層を設けることで、試料溶液の導入が円滑に行われるが、レシチン層は酵素反応には必須ではない。また、レシチン層20は、スぺーサー24とカバー25を組み合わせたカバー部材間の四隅、すなわち試料液供給路に露出する面に形成してもよい。

【0031】上記のようにしてCMC層18、CMC層29、ChDH-ChE-フェリシアン化カリウム-界面活性剤-NAD-ジアホラーゼ-緩衝剤層19、NQS層21、レシチン層20からなる反応層を形成した後、カバー25およびスぺーサー24を図4中、一点鎖線で示すような位置関係をもって接着することにより、コレステロールセンサが完成する。

【0032】《実施例5》実施例2と同様にして基板上の電極系上にCMCの0.5wt%水溶液を滴下し、乾燥させてCMC層18を形成した。次に、実施例2と同様にして、スぺーサー24とカバー25を組み合わせたカバー部材間の四隅にCMCの0.5wt%水溶液を滴下し、乾燥させてCMC層23を形成した。つまり、ChDHを10ユニット/ml、NADを50mM、ジアホラーゼを10ユニット/ml、電子メディエーターであるフェリシアン化カリウムを50mM、シュドモナス由来のChEを1kユニット/ml、界面活性剤であるn-オクタリル- β -D-チオグルコシドを0.5wt%、および緩衝剤であるTris塩酸塩0.3Mを含む混合水溶液をpHを8.5に調整した。この混合水溶液5 μ lをCMC層23を覆うように滴下し、常温乾燥空気中で30分間乾燥させることにより、ChDH-ChE-フェリシアン化カリウム-界面活性剤-NAD-ジアホラーゼ-緩衝剤層19を形成した。

【0033】このようにして反応層を形成したスぺー

ー24とカバー25からなるカバー部材を前記の基板に接着することによりコレステロールセンサが完成する。このように、電極部と隔てて反応層を設け、電極表面にはCMC層のみを形成する方が、電極表面に反応層を設けるよりも、単位基質濃度あたりの電流値が高くなる。

【0034】なお、上記実施例に示した各試薬の相持量は、実施の一例であり、本発明はこれらによって限定されるものではない。また、実施例2に示したレシチン層20のように、本発明のコレステロールセンサには、反応層の表面に、試料溶液の反応試薬系への導入を容易にするために脂質を含む層を設けることができる。この用途に用いる脂質として、上記の実施例に用いたホスファチジルコリンの他、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン等のリン脂質などの両親媒性脂質を用いることができる。さらに、反応層を形成するための親水性高分子としては、上記の実施例に用いたカルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンの他、ポリビニルアルコール、水溶性セルロース誘導体、特にエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース；ゼラチン、ポリアクリル酸およびその塩、デンアンおよびその誘導体、無水マレイン酸およびその塩、ポリアクリルアミド、メタクリレート樹脂、ポリ2-ヒドロキシエチルメタクリレートなどを用いることができる。

【0035】また、上記実施例中ではChEとしてシュードモナス類由来のものを用い、界面活性剤として、 n -オクチル- β -D-チオグルコシドを用いているが、シュードモナス類由来のChEを用いる場合、Lubrol PX、コル酸ナトリウム、ドデシル- β -マルトシド、DK-エステルを用いても良好な応答を示す。また、ChEとしては、ほ乳類脳由来のものを用いることも可能で、この場合、コル酸ナトリウムなどの胆汁酸骨格を持つ界面活性剤を用いることで、非常に良好な応答性を示す。また、上記の実施例2〜5では、測定極と対極のみの二極電極系について述べたが、参照極を加えた三電極方式にすれば、より正確な測定が可能である。

【0036】

【発明の効果】以上のように本発明によれば、酸素の影響を受けることなく、より短い時間で試料液中のコレステロール濃度を測定できるコレステロールセンサが得られる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例におけるコレステロールセンサの構成を示す図である。

【図2】同コレステロールセンサによる測定結果の例を示す図である。

【図3】同コレステロールセンサの測定例におけるコレステロール濃度と電流値の関係を示す図である。

【図4】本発明の他の実施例におけるコレステロールセンサの要部の構成を示す断面図である。

【図5】同コレステロールセンサの反応層を除いた分解斜視図である。

【図6】本発明のさらに他の実施例におけるコレステロールセンサの要部の構成を示す断面図である。

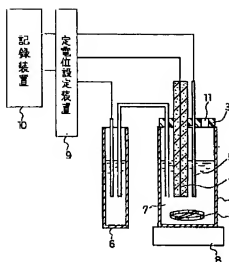
【図7】本発明のさらに他の実施例におけるコレステロールセンサの要部の構成を示す断面図である。

【図8】本発明のさらに他の実施例におけるコレステロールセンサの要部の構成を示す断面図である。

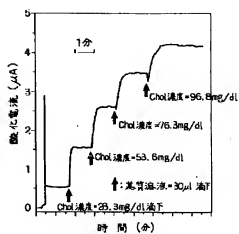
【符号の説明】

- 1 ガラスセル
- 2 攪拌子
- 3 電極固定器具
- 4 測定極
- 5 対極
- 6 参照極
- 7 反応溶液
- 8 スタラーマシ
- 9 定電位設定装置
- 10 記録装置
- 11 貫通孔
- 12 絶縁性の基板
- 13、14 リード
- 15 測定極
- 16 対極
- 17 絶縁層
- 18 CMC層
- 19 ChDH-ChE-フェリシアン化カリウム-界面活性剤-NAD-ジアホラーゼ-緩衝剤層
- 20 レシチン層
- 21 NQS層
- 22 ChDH-ChE-界面活性剤-NAD-緩衝剤層
- 23 CMC層
- 24 スペーサー
- 25 カバー
- 26 スリット
- 27 空気孔
- 28 試料液供給路

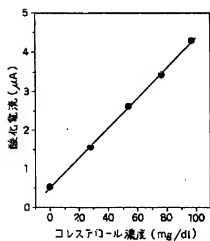
【図1】



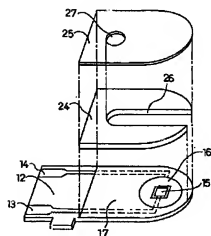
【図2】



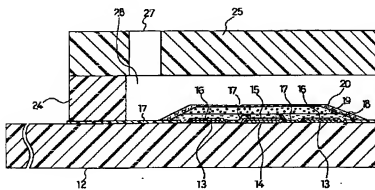
【図3】



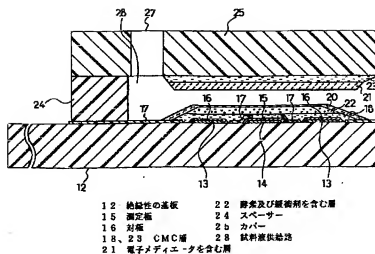
【図5】



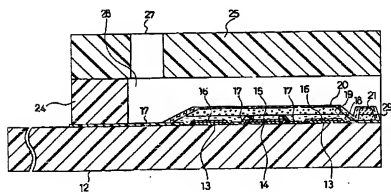
【図4】



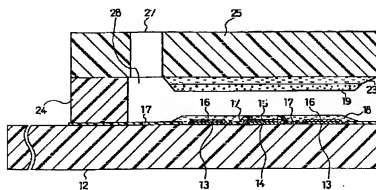
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(72)発明者 南海 史朗

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

(72)発明者 岩田 潤子

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内